

## 髄芽腫における免疫組織化学的及び細胞遺伝学的異常と その臨床的意義

—c-myc, N-myc,  $\beta$ -,  $\gamma$ -カテニン, cyclin D1に着目して—

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳機能制御学

(旧講座：脳神経外科学)

(主任：山下純宏教授)

見 崎 孝 一

髄芽腫 (medulloblastoma) は小児の小脳虫部に好発する悪性腫瘍で、髄腔内に播種しやすく、一般に根治は難しい。全脳全脊髄照射の導入により長期生存が得られるようになったが、これに伴い小児では知能低下や低身長など遅発性放射線障害の問題が生じた。また、未だ治療抵抗例が存在する一方で、予測に反して治癒する症例もあり、治療の個別化が望まれている。分子生物学的手法の発達した今日でも、この腫瘍の pathogenesis を十分に説明しうる細胞遺伝学的異常は発見されていない。予後不良因子として c-myc の遺伝子増幅 (4%) と mRNA の過剰発現 (50%) が報告されているが、c-myc mRNA の過剰発現が遺伝子増幅のみでは説明し得ないことから、遺伝子増幅によらない c-myc の発現調節機構が注目されている。今回我々は、c-myc が Wnt シグナル伝達系の標的分子であることから、 $\beta$ -カテニンをはじめとする Wnt シグナル関連分子について、手術標本を免疫組織化学的及び分子生物学的に解析した。当科で手術した髄芽腫 24 例を対象に、c-myc,  $\beta$ -,  $\gamma$ -カテニン, cyclin D1 の発現を免疫組織化学的に、c-myc, N-myc, cyclin D1 の遺伝子増幅を弁別式 PCR で検討した。また  $\beta$ -,  $\gamma$ -カテニンの変異を、1本鎖DNA高次構造多型 (PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 法及び直接シーケンス法で解析した。解析可能であった 5 例に対してウエスタンブロット解析を追加した。蛋白発現と遺伝子変異及び増幅の臨床的意義を Kaplan-Meier 生存曲線を用いて解析した。免疫組織化学では  $\gamma$ -カテニンの細胞質/細胞膜陽性所見を 24 例中 9 例 (37%) に認めた。 $\beta$ -カテニンの細胞質/細胞膜陽性所見を 19 例 (79%) に、cyclin D1 及び c-myc の核染色をそれぞれ 6 例 (25%) 及び 21 例 (83%) に認めた。 $\gamma$ -カテニンにおいてウエスタンブロットの結果と免疫組織化学所見が相関した。弁別式 PCR にて c-myc, N-myc とともに 1 例ずつ遺伝子増幅が検出された。両症例とも組織学的には予後不良の large cell/anaplastic type であり、c-myc 増幅例は術後 6 ヶ月で腫瘍死したが、N-myc 増幅例は術後 10 年以上生存し対照的な結果を示した。 $\beta$ -,  $\gamma$ -カテニンの変異は 1 例も検出されなかった。Kaplan-Meier 解析から、 $\gamma$ -カテニンの発現のみが予後良好と相関した ( $p=0.003$ )。また診断時に髄腔内播種を認めなかった症例 (Chang 分類, M0 群) は、播種を認めた症例 (M1~3 群) より有意に ( $p=0.0002$ ) 予後良好であった。さらに M0 群を  $\gamma$ -カテニンの発現の有無で検討したところ、 $\gamma$ -カテニン陽性群は有意に予後良好であった ( $p=0.022$ )。cyclin D1 は有意な相関を示さなかった ( $p=0.057$ ) が、陽性群は全例死亡した。 $\beta$ -カテニン、c-myc の発現と予後は相関しなかった ( $p=0.31, 0.53$ )。髄芽腫において、予後を予測し治療を個別化する上で、 $\gamma$ -カテニンの免疫組織化学的検索が有用と考えられた。また cyclin D1 の免疫組織化学的評価は予後を推定する指標となる可能性が示された。

**Key words** medulloblastoma, c-myc, N-myc,  $\gamma$ -catenin, cyclin D1

髄芽腫 (medulloblastoma) は、小児の小脳虫部に好発する悪性腫瘍で、ほとんどが小児期 (15 歳以下) に発生するが、まれに 20~40 代成人にも発生する (9%)。小児脳腫瘍では星細胞腫について多く (12.9%)、ピークは 8 歳前後にある<sup>1)</sup>。髄腔内に播種しやすく一般に根治が難しいことから、本腫瘍は WHO 脳腫瘍分類 (2000 年改訂) で grade IV に分類されている<sup>2)</sup>。髄芽腫の治療は、腫瘍を可及的に切除し放射線治療、化学療法を併用するのが一般的である。1970 年代に導入された全脳全脊髄照射

により治療成績は著しく向上したが、生存期間が延びるに従い新たに知能低下、低身長を始めとする遅発性放射線障害の問題が発生した<sup>3)</sup>。現在は症例を、発症年齢 (3 歳以下)、術後残存腫瘍、髄腔内播種の 3 つの因子で分類し、いずれにも該当しなければ standard risk 群、一つでも該当すれば high risk 群として扱い、それぞれに照射線量と化学療法を設定している<sup>4)5)</sup>。これにより 5 年生存率は、1960 年代の 30% から現在 60% に向上し、群別では standard risk 群で 70%、high risk 群で 25% となった<sup>6)</sup>。

平成 15 年 10 月 31 日受付, 平成 15 年 11 月 21 日受理

Abbreviations : APC, adenomatous polyposis coli; CSF, cerebrospinal fluid; D2R, dopamine D2 receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MBEN, medulloblastoma with extensive nodularity; PCR-SSCP, PCR-single strand conformation polymorphism; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween 20

しかし、未だ治療抵抗例が存在する一方で、予測に反して治癒する症例も報告されている<sup>7)</sup>。今後、治療の個別化、放射線障害の軽減など克服すべき点も多い。

分子生物学的手法の発達により、髄芽腫においても細胞遺伝学的解析が盛んに行われてきたが、pathogenesisを十分に説明し得る遺伝子異常はまだ発見されていない。最も頻度の高い第17染色体短腕のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH 17p) も髄芽腫の30-50%でしか検出されない<sup>8)~10)</sup>。今日、予後不良因子として臨床的に最も意義あるものはc-myc遺伝子の増幅とmRNAの過剰発現であり<sup>6)11)~14)</sup>、前者はN-mycと並び<sup>15)16)</sup>近年明らかにされた予後不良の亜型large cell/anaplastic typeと相関することが示された<sup>15)17)18)</sup>。しかし、c-mycの遺伝子増幅は4%前後<sup>11)13)~15)</sup>にしか検出されず、mRNAの過剰発現が50%<sup>12)13)</sup>と高頻度であることを説明し得ないことから、c-mycの発現調節因子について解析が行われてきた。従来、c-mycはWntシグナル上でAPC (adenomatous polyposis coli), Axin,  $\beta$ -カテニンにより転写レベルで発現調節を受けていると考えられ<sup>19)20)</sup>、髄芽腫においてもこれらの変異が解析された

が、それぞれ5%程度であり<sup>21)~26)</sup>、c-mycの過剰発現を説明するには至っていない。しかし、近年 $\gamma$ -カテニンもWntシグナル上にあること、 $\beta$ -カテニンはc-mycよりむしろcyclin D1を活性化し、一方で $\gamma$ -カテニンがむしろc-mycを活性化すること、が報告され注目されている<sup>27)28)</sup>。 $\beta$ -カテニンは髄芽腫ではエクソン3で変異が報告されている<sup>21)~25)</sup>が、 $\gamma$ -カテニンについてはこれまで髄芽腫で解析されたことがなく、唯一胃癌においてエクソン3で変異が検出されている<sup>29)</sup>。本研究では髄芽腫においてc-myc遺伝子を取り巻く $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニン、cyclin D1, N-myc分子に着目し、これら分子を免疫組織化学的、分子生物学的に解析し、その臨床的意義について検討した。

## 対象および方法

### I. 対象

金沢大学医学部附属病院脳神経外科で過去34年間に経験した髄芽腫24例を対象とした。摘出標本は3.7%ホルムアルデヒドまたは4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後、HEにて染色した。病理組織学的診断は、WHOの脳腫瘍分

Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemistry and Western blotting

Antibody	Host	Isotype	Clone	Source
$\beta$ -catenin	Mouse	IgG1	14	Transduction Laboratories, Lexington, USA
$\gamma$ -catenin	Mouse	IgG2a	15	Transduction Laboratories, Lexington, USA
cyclin D1	Mouse	IgG2a	DCS-6	DAKO, Glostrup, Denmark
c-myc	Mouse	IgG1	9E10	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
$\alpha$ -tubulin	Mouse	IgG1	DM1A	Oncogene Research Products, Cambridge, USA

Table 2. Oligonucleotide primers

Gene	Sense primer and antisense primer sequences	Product size (bp)	Final concentration (nM)
c-myc	5'-GCTCCAAGACGTTGTGTGTTTCG-3' 5'-GGAAGGACTATCCTGCTGCCAA-3'	150	800
N-myc	5'-AGTCCTTCCACCCTCTCCT-3' 5'-CACCCAGCAACCCCTAAAC-3'	151	300
cyclin D1	5'-GCTGCGAAGTGGAACCATC-3' 5'-CAGGACCTCCTTCTGCACAC-3'	140	500
D2R	5'-CCACTGAATCTGTCCTGGTATG-3' 5'-GTGTGGCATAGTAGTTGTAGTGG-3'	110	200
GAPDH	5'-CATCCCTTCTCCCCACACAC-3' 5'-AGTCCCAGGGCTTTGATTG-3'	104	60
$\beta$ -catenin	5'-ATGGAACCAGACAGAAAAG-3' 5'-TACAGGACTTGGGAGGTATC-3'	157	500
$\gamma$ -catenin	5'-GGAGCAGCCTATCAAGGTGACTGAGTGG-3' 5'-GAGACCCCTACAATCTGCCTCCTTTCA-3'	282	500

D2R, dopamine D2 receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Table 3. PCR conditions

Gene	Denaturation [Temperature (°C) /Duration (sec)]	Annealing [Temperature (°C) /Duration (sec)]	Extension [Temperature (°C) /Duration (sec)]	Cycles for amplification
c-myc / D2R	94/60	55/60	72/60	35
cyclin D1 / D2R	94/60	55/60	72/60	35
N-myc / GAPDH	94/60	53/60	72/60	30
$\beta$ -catenin	94/60	53/60	72/60	35
$\gamma$ -catenin	94/60	56/60	72/60	35

Table 4. Summary of clinical, histological, immunohistochemical and genetic study

Case	Gender	Age (y.o.)	Subtype	Chang staging	Tumor resection	Post-op therapy	Gene amp	Immunohistochemistry						WB	Survival (mo.)
								$\beta$ -cat		$\gamma$ -cat		cyclin D1	c-myc	$\gamma$ -cat	
								n	c/m	n	c/m	n	n		
1	F	1	Desmo*	T3a M0	STR	RT	—	—	++	—	+	—	++	NA	398 alive
2	M	7	Classic	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	+++	—	—	+	+++	NA	10
3	M	12	Classic	T3a M0	PR	RT	—	—	+++	—	—	—	++	NA	4
4	M	5	Classic	T2 M0	STR	RT	—	—	—	—	—	+	—	NA	15
5	M	7	Classic	T2 M0	PR	RT	—	—	++	—	—	—	++	NA	30
6	F	6	Classic	T3a M0	STR	RT	—	—	+++	—	—	—	++	NA	44
7	M	4	Classic	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	—	—	—	—	++	NA	5
8	M	5	Desmo	T2 M0	GTR	RT	—	—	—	—	—	—	—	NA	269 alive
9	M	27	Classic	T2 M2	STR	CT, RT	—	—	—	—	—	+	+++	NA	13
10	M	9	Desmo	T2 M1	STR	RT	—	—	++	—	—	—	++	NA	15
11	M	6	Desmo	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	++	—	+++	—	+	NA	173 alive
12	M	11	Classic	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	+++	—	++	—	—	NA	169 alive
13	M	5	Classic	T3a M3	GTR	CT, RT	—	—	++	—	—	—	++	NA	5
14	F	1	Classic	T3a M2	STR	None	—	—	+++	—	—	+	+	NA	0.5
15	F	13	Classic	T2 M0	STR	CT, RT	—	—	++	—	—	+	++	NA	75
16	F	2	Large	T3a M0	GTR	CT, RT	N-myc	—	++	—	+	—	++	NA	136 alive
17	M	22	Classic	T2 M0	GTR	RT	—	—	++	—	+++	—	+++	NA	133 alive
18	M	11	Classic	T2 M0	STR	CT, RT	—	—	++	—	+++	—	+	NA	88 alive
19	F	2.5	Large	T4 M3	PR	CT, RT	c-myc	—	—	—	—	—	+++	NA	6
20	M	0.1	Classic	T4 M2	PR	None	—	—	++	—	—	—	+	±	2
21	M	1.5	Classic	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	+++	—	—	—	+	±	34 alive
22	M	11	Classic	T3a M0	GTR	CT, RT	—	—	+	—	++	+	+++	+	21
23	M	11	Classic	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	+++	—	++	—	++	+	23 alive
24	M	1.5	Classic	T3a M0	STR	CT, RT	—	—	++	—	+	—	—	+	11

amp, amplification; cat, catenin; c/m, cytoplasmic and membranous staining; CT, chemotherapy; Desmo, Desmoplastic; F, Female; GTR, gross total resection; Large cell, Large cell/anaplastic; M, male; mo., months; n, nuclear staining; NA, not available; op, operative; PR, partial resection; RT, radiotherapy; STR, subtotal resection; WB, Western blot; y.o., years old.

\*medulloblastoma with extensive nodularity.

Immunoreactivity; —, <5%; +, 5 to 50%; ++, 50 to 90%; +++, ≥90%.

類 (2000年改訂)<sup>2)</sup>に従った。

## Ⅱ. 免疫組織化学染色とその評価

厚さ4 $\mu$ mのパラフィン切片を作製し, poly-L-lysine (Sigma, Saint Louis, USA) 処理スライドガラス上に張り付け乾燥させた。キシレン (和光純薬, 東京) を用いて脱パラフィン後, 0.1M PBS (pH 7.4) で洗浄, 0.3% (c-mycの発現解析の場合は3%) 過酸化水素水加メタノールで処理し, 内因性ペルオキシダーゼを失活させた。0.1M PBS (pH 7.4) で洗浄後,  $\beta$ -カテニン,  $\gamma$ -カテニン及びc-mycには5%スキムミルク入りPBSをcyclin D1には正常血清を用いて室温で60分間ブロッキングした。第一次抗体は表1に示したものを使用し, そのうち抗 $\beta$ -カ

テニン及び $\gamma$ -カテニン抗体は500倍, c-myc抗体は200倍, cyclin D1抗体は50倍にそれぞれ緩衝液 (DAKO antibody diluent with background reducing component, DAKO Corporation, Carpinteria, USA) で希釈し, 4℃で一晩反応させた。対応する第二次抗体を室温で20分間, 続いて標識したストレプトアビジン・ビオチンで室温10分間それぞれ反応させた。なお $\beta$ -カテニン,  $\gamma$ -カテニン及びc-mycの免疫染色にはLSABキット (DAKO Corporation), cyclin D1についてはABCキット (Vector Laboratories, Burlingame, USA) を用いた。その後, 0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン (Sigma) 処理により発色させ, ヘマトキシリンで核染色を行っ



た。陽性コントロールとして $\beta$ -カテニン<sup>30)</sup>、 $\gamma$ -カテニン<sup>30)</sup>及びc-myc<sup>31)</sup>は正常大腸粘膜を、cyclin D1<sup>32)</sup>は乳癌組織を用いた。陰性コントロールは第一次抗体だけを使用しないものとした。

各抗体の染色強度については、腫瘍細胞巣を含む200倍の鏡検視野3箇所においてそれぞれ100個の細胞中の陽性細胞数を計測し、その平均を百分率で算出し、それぞれの分子の陽性率として評価した。対象分子の発現陽性率が5%以下を－、5～50%を＋、50～90%を++、90%以上を+++と定義した<sup>33)</sup>。

### Ⅲ. ウェスタンブロット解析

腫瘍組織における $\gamma$ -カテニン蛋白の発現量を調べるため、 $\alpha$ -チューブリンを内部コントロールとしたウェスタンブロット解析を行った<sup>34)35)</sup>。凍結保存された組織を細胞溶解液〔1%

SDS, 1.0mM sodium ortho-vanadate, 10mM Tris (pH 7.4)] 中で超音波破碎後、直ちに各々を4℃, 10,000rpmで20分間遠心し上清を回収した。マイクロウェーブにて10秒間処理し、等量の10% 2-メルカプトエタノールを含むSDS緩衝液を加え100℃で5分間加熱した。各レーンあたり10 $\mu$ gの蛋白質を濃度勾配(4%～20%)付きポリアクリルアミドゲル(第一化学, 東京)で40mA, 30分間泳動した。ゲル上で分離された蛋白質をニトロセルロース膜(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)に転写し、ECLキット(Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)付属のブロッキング試薬を2%加えたトリス塩酸緩衝液(Tris-buffered saline-Tween 20, TBS-T)で2時間ブロッキングした。一次抗体として、2%ブロッキング試薬入

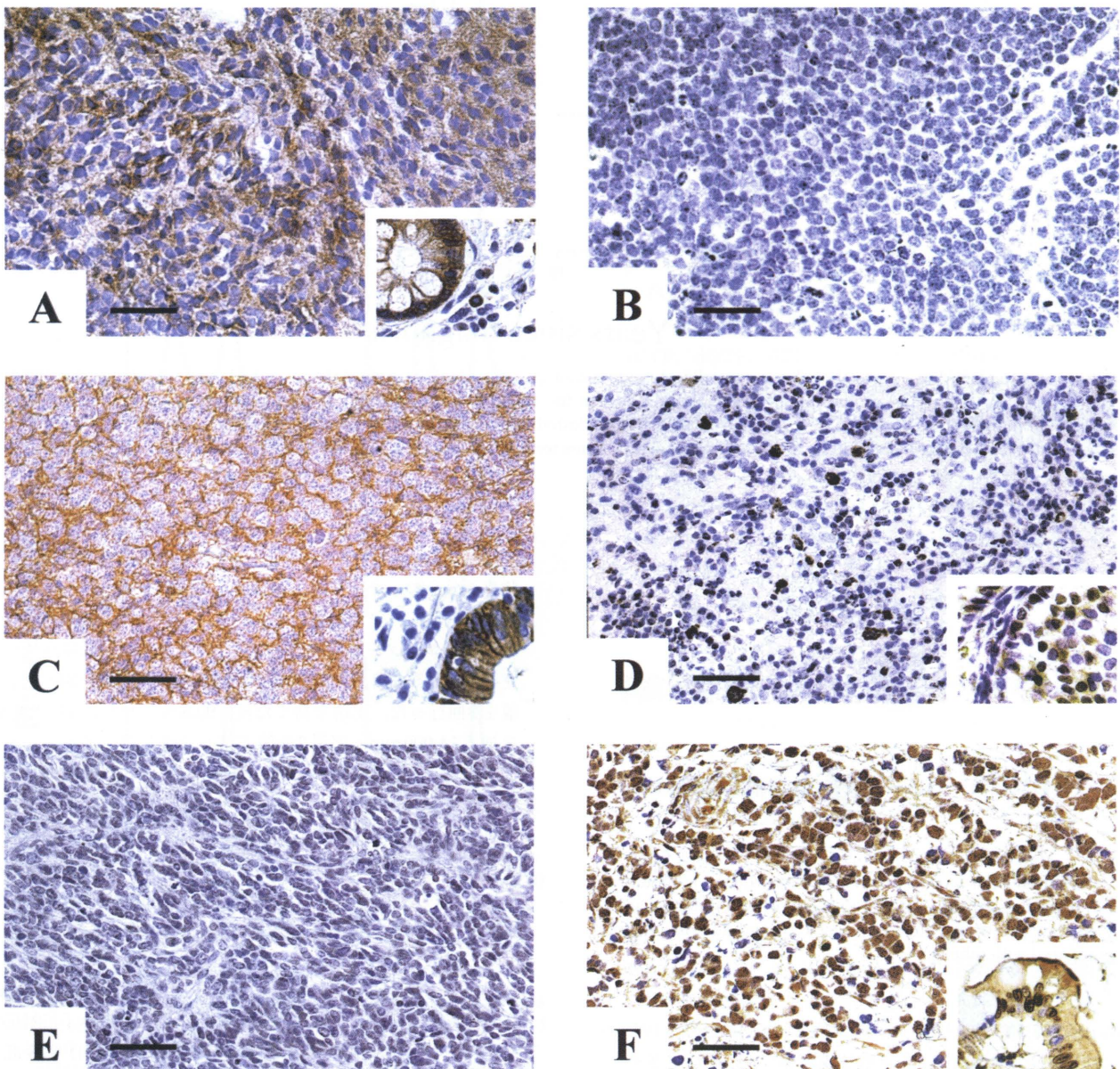


Fig. 1. Photomicrographs of immunohistochemistry with  $\gamma$ -,  $\beta$ -catenin, cyclin D1 and c-myc. Positive (A, case 11) and negative (B, case 19) staining of  $\gamma$ -catenin. Cytoplasm and cell membrane was diffusely immunostained but not the nucleus (A). Similarly,  $\beta$ -catenin was diffusely immunostained in the cytoplasm/membrane (C, case 21). Nuclear staining was detected in a small fraction of the tumor cells (<5%). Cyclin D1 was expressed in the nucleus in a small fraction of the tumor cells (D, case 14) but negative in case 3 (E). On the contrary, nuclear expression of c-myc was diffusely found (F, case 22). Insets show positive controls, respectively, and the scale bars indicate 20  $\mu$  m.

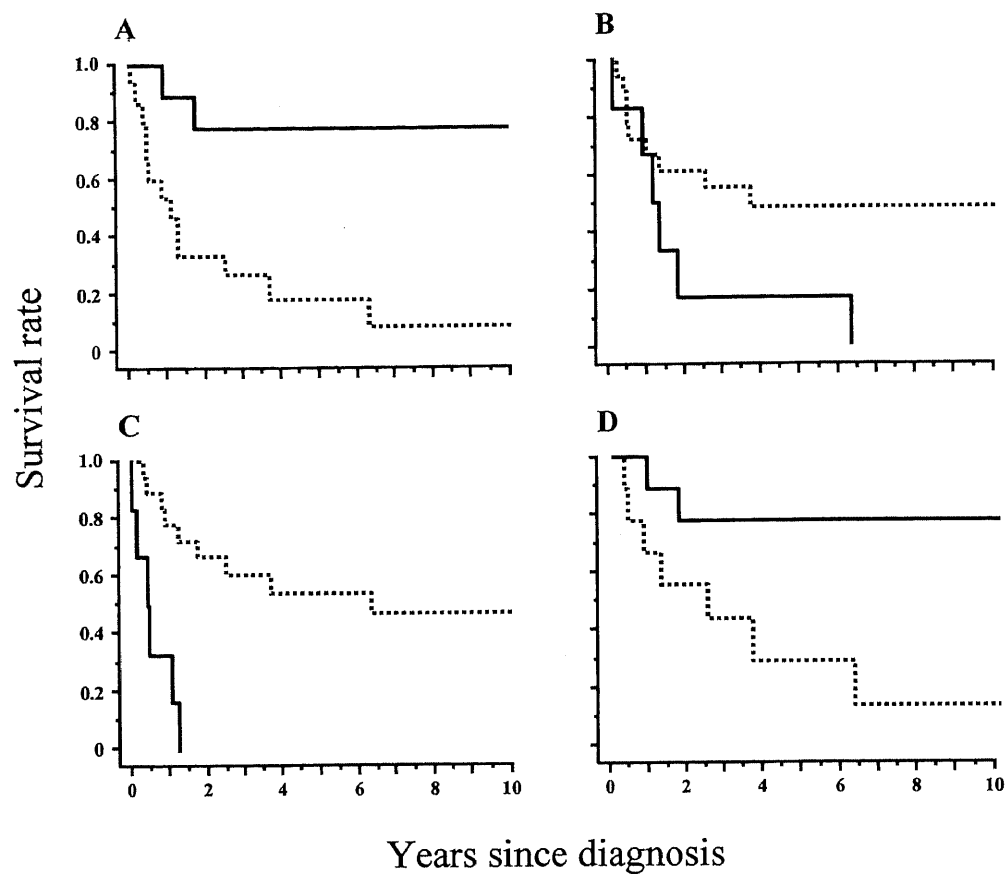


Fig. 2. The Kaplan-Meier survival analyses according to expression of  $\gamma$ -catenin (A), cyclin D1 (B) and M stage of Chang classification (C). Overall survival of M0 group was further analyzed between the subsets with or without  $\gamma$ -catenin expression (D). Full line means positive immunoreactivity (A, B, D) or M1 to 3 group (C), and dotted line means negative immunoreactivity (A, B, D) or M0 group (C). The survival curves were analyzed by the log-rank test and p values were 0.003 (A), 0.057 (B), 0.0002 (C) and 0.022 (D), respectively.

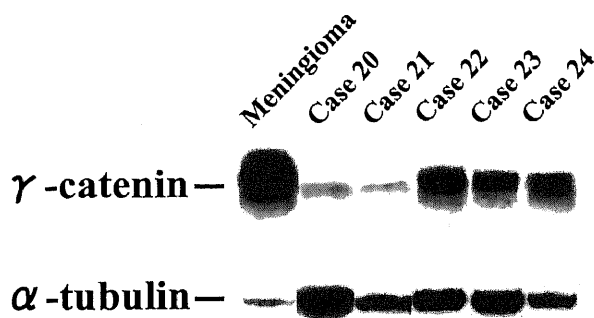


Fig. 3. Western blot analysis for  $\gamma$ -catenin in 5 cases (case 20-24). Meningioma was used as positive control and  $\alpha$ -tubulin as an internal control.  $\gamma$ -Catenin expression was detected in all cases analyzed, but those of cases 20 and 21 were scarce compared with others.

りTBS-Tで希釈した抗 $\gamma$ -カテニン抗体 (200倍), 抗 $\alpha$ -チューリン抗体 (100倍) (表1) をそれぞれ室温で1時間反応させた。その後, HRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham Biosciences) と1時間反応させ, ECLキットにて目的の蛋白質を検出・同定した。

#### IV. DNA抽出

腫瘍標本からのDNAの抽出は, Fujisawaら<sup>36)</sup>の方法に従っ

た。厚さ4 $\mu$ mのパラフィン切片をHE染色後, 光学顕微鏡下腫瘍部分をマーキングし, 連続する未染プレパラートより腫瘍組織を回収し, キシレンにて脱パラフィンした。組織ペレットを99.8%エタノール (和光純薬) で再浮遊させ, 微量高速冷凍心器 (トミー精工, 東京) で14,000rpm, 室温5分間の遠心分離を2回行った。上清を捨てた後, 99.8%アセトン (和光純薬) を加え14,000rpm, 室温2分間で遠心分離した。アセトンを及的に除去後, 組織ペレットを風乾した。この組織にプロテアーゼK (Sigma) を加え, 37℃で一晩消化し, 98℃, 10分プロテアーゼKを失活させた。存命中の患者には事前に研究主旨を説明し同意を得た。対照DNAは, 本研究の主旨を説明し同意が得られた正常成人の血液からQIAamp DNA Mini 1 (QIAGEN) を用いて抽出した。

#### V. 弁別式PCR法

c-myc, N-myc, cyclin D1の遺伝子増幅を調べるためIwataら<sup>37)</sup>の方法に従い弁別式PCR法で解析した。各遺伝子に対応するPCRプライマーの作成をSigma Genosis (北海道) に委託した<sup>38)~40)</sup>。センスプライマーのみ5'末端にヨードジカルボチミン (indodicarbocytamine, Cy5, Sigma Genosis) の蛍光色素標識した。表2に各プライマーの塩基配列, PCR産物のサイズ及び反応溶液中の終濃度を示す。内部コントロールはc-myc及びcyclin D1に対してはドーパミン受容体 (dopamine)



receptor, D2R) 遺伝子を, N-myc 遺伝子に対してはグリセルアルデヒドリン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 遺伝子を用いた. 陽性コントロールとして c-myc に対しては, 既に遺伝子増幅が報告されている子宮頸癌細胞株 NCC-c-CX-1 (CX-1)<sup>38)</sup>, N-myc は神経芽細胞腫株 IMR-32<sup>39)</sup>, cyclin D1 は乳癌組織<sup>41)</sup>を使用した.

PCR には, 抽出した DNA のうち 1  $\mu$ l を 1 回の反応の鋳型として用いた. 反応液は表 2 の終濃度に調整した標的遺伝子のプライマーと, 内部コントロール遺伝子のプライマーの 2 セット, 200  $\mu$ M の各デオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25 単位の Taq DNA ポリメラーゼ, PCR 緩衝液 [終濃度 15mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM KCl] 及び 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (以上 Applied Biosystems, Foster city, USA) に, 滅菌蒸留水を加え全量 10  $\mu$ l に調整した. PCR は核酸増幅装置サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2700-10, Applied Biosystems) で行った. 反応は, 94  $^{\circ}$ C で 7 分間の熱変性後, 各プライマーセットのアニーリング温度に応じたサイクルプログラムを行い, 最後に 72  $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行った. 表 3 に標的遺伝子と

内部コントロールの各プライマーセットの組み合わせ, サイクル数とサイクル数を示す. PCR 増幅後, 産物を反応停止液 (Amersham Pharmacia Biotech) で希釈し, 変性ポリアクリルアミドゲル Long Ranger (FMC BioProducts, Rockland, USA) で 50  $^{\circ}$ C (45  $^{\circ}$ C), 定電力 (34W) で泳動分離した (ALFred DNA Sequencer, Amersham Bioscience, Piscataway, USA).

遺伝子増幅の判定は, DNA 定量ソフト (Allelinks version 1.0 Pharmacia Biotech) を用いた. 標的遺伝子及び内部コントロール遺伝子の DNA 断片に相当する蛍光強度ピーク領域の面積を各々測定し, PCR 増幅産物量とした. 健康人の DNA を対照として標的遺伝子と内部コントロール遺伝子の PCR 増幅産物量の比の平均値  $\bar{x}$  及び標準偏差 SD を求めた. 対照 DNA の産物量の比は  $\bar{x} \pm 3SD$  以内であったため,  $2\bar{x} + 3SD$  以上を遺伝子増幅ありとした<sup>42)</sup>.

## VI. 1 本鎖 DNA 高次構造多型 (PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 法および直接シーケンス法による変異解析

### 1. PCR-SSCP 法によるスクリーニング

$\beta$ -カテニン, これまでに髄芽腫で変異が報告されているエクソン 3 を解析した<sup>21)~25)</sup>.  $\gamma$ -カテニンについてはこれまで髄芽腫での解析はなく, 唯一胃癌で変異が検出されているエクソン 3 を解析した<sup>29)</sup>. PCR プライマー<sup>23)29)</sup>の作成は Amersham Pharmacia Biotech (東京) に委託した. PCR には, 抽出した DNA のうち 1  $\mu$ l を 1 回の反応の鋳型として用いた. 表 2 のプライマー 1 セット, 200  $\mu$ M の各デオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25 単位の Taq DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 10  $\times$  PCR 緩衝液 (Applied Biosystems) 1  $\mu$ l, 1.5 mM の MgCl<sub>2</sub> に滅菌蒸留水を加え全量 10  $\mu$ l に調整した. 核酸増幅装置サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2700-10, Applied Biosystems) に 94  $^{\circ}$ C で 7 分間の熱変性後, 各プライマーに応じたサイクルプログラムを行い, 最後に 72  $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行った. 表 3 に PCR 条件を示す. PCR 終了後, 産物に反応停止液 (95% ホムアルデヒド, 20mM EDTA, 0.05% キシレンシアノール 0.05% プロモフェノールブルー) を加え, 95  $^{\circ}$ C 10 分間の熱変性後, 氷水にて急速冷却し, 6% グリセロール含有 5% ポリアクリルアミドゲルで 40W, 4 時間, 送風冷却しながら泳動したゲルは DNA Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて染色した<sup>43)</sup>.

### 2. 直接シーケンス法による塩基配列の決定

PCR-SSCP 法で異なる泳動パターンを示した PCR 産物に対し, PCR 直接シーケンス法により塩基配列を決定した DNA サイクルシーケンスキット (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, Applied Biosystems) を用いた. サンプルを調整後, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2700-10, Applied Biosystems) で増幅した. 条件は 96  $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性後, 変性 96  $^{\circ}$ C 10 秒, アニーリング 50  $^{\circ}$ C 5 秒伸長反応 60  $^{\circ}$ C 4 分のプログラムを 28 サイクル行った. 反応液をダイナーミネータ除去キット (Centri-Sep Columns Princeton Separations) を用いて精製し, 毛細管型塩基配列解読装置 (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystems) にて塩基配列を決定した.

### VI. 統計学的解析

生存率を Kaplan-Meier 法にて算出し, Logrank 検定した.

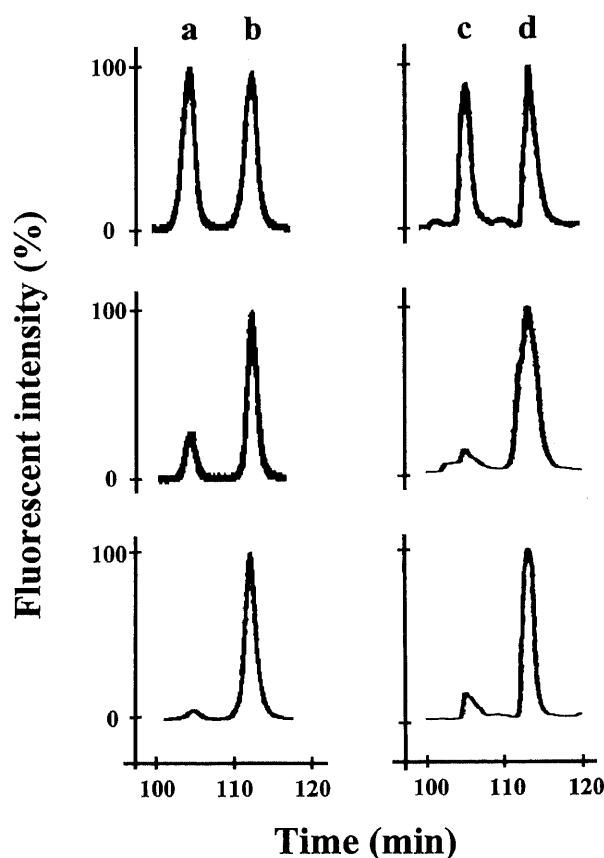


Fig. 4. Differential PCR for c-myc (left column) and N-myc (right column) gene amplification. Data of negative controls (blood), positive controls (left, CX-1; right, IMR-32) and positive cases (left, case 19; right, case 16) are shown in upper, middle, lower panels, respectively. In each data, left peaks mean internal control (a, D2R; c, GAPDH), and right peaks mean target genes (b, c-myc; d, N-myc). c-myc and N-myc gene amplification was detected in case 19 (c-myc / D2R ratio, 18.87) and case 16 (N-myc / GAPDH ratio, 7.63), respectively. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (%).

陰率5%未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありと判定した。

## 成 績

表4に各症例の臨床情報、弁別式PCR、免疫組織化学、ウエスタンブロットの解析結果を示す。

### I. 免疫組織化学

$\gamma$ -カテニンの陽性所見を24例中9例 (37%) に認めた。発現部位は細胞質/細胞膜で、核染色は認めなかった (図1A, B)。 $\beta$ -カテニンは細胞質/細胞膜の陽性所見を19例 (79%) で認め (図1C)、うち2例 (症例13, 21) でごく一部分 (<5%) に核陽性所見を認めた。cyclin D1及びc-mycの核陽性所見はそれぞれ6例 (25%) 及び21例 (83%) に認めた (図1D, E, F)。

Kaplan-Meier 解析上、 $\gamma$ -カテニンの発現のみが予後と関連した ( $p=0.003$ )。術後平均生存期間は陽性群で128ヶ月、陰性群で35ヶ月であり、陽性群は予後良好であった (図2A)。cyclin D1では有意な相関は得られなかったが ( $p=0.057$ )、術後平均生存期間は陽性群で22ヶ月、陰性群で86ヶ月であり、陽性群は予後不良の傾向があった (図2B)。 $\beta$ -カテニン、c-mycについてはp値がそれぞれ0.31, 0.53であり、予後と関連しなかった。生存期間を5年、10年に限定して解析したが、有意差が得られたのは $\gamma$ -カテニンのみであった。また、診断時に髄腔内播種を認めなかった症例 (Chang分類, M0群)<sup>44)</sup>は、播種を認めた症例 (M1~3群) より有意に ( $p=0.0002$ ) 予後良好であった (図2C)。さらにM0群を $\gamma$ -カテニンの発現の有無で検討したところ、 $\gamma$ -カテニン陽性群は有意に予後良好であった ( $p=0.022$ , 図2D)。

### II. ウエスタンブロット解析

免疫組織化学で予後と相関の得られた $\gamma$ -カテニンの発現程度を確認するため、新鮮凍結標本が得られた最近の5例 (症例20~24) についてウエスタンブロット法で解析した (図3)。全例で $\gamma$ -カテニンを検出したが、免疫組織化学で陰性を示した症例20, 21の発現量は極めて少なかった。ウエスタンブロット解析における $\gamma$ -カテニンの発現は免疫組織化学所見と関連した。

### III. 弁別式PCR法

健常人DNAにおける標的遺伝子と内部コントロール遺伝子のPCR増幅産物量の比の平均値はc-myc, N-myc, cyclin D1それぞれ0.97, 1.04, 0.98であり、標準偏差は0.22, 0.24, 0.26であった。遺伝子増幅を示したのはc-myc及びN-mycでそれぞれ1例 (症例19及び16) であり、内部コントロールとの比は18.87, 7.63であった (図4)。cyclin D1の遺伝子増幅は1例も検出されなかった。

### IV. PCR-SSCP法及び直接シーケンス法による変異解析

全例でPCR-SSCP法による $\beta$ -カテニン及び $\gamma$ -カテニンの変異遺伝子は検出されなかった。 $\beta$ -カテニンの核陽性例で高頻度に遺伝子変異を認めたとの報告<sup>24)</sup>から、 $\beta$ -カテニンの部分的核陽性所見 (5%以下) を示した2例 (症例13, 21) についてエクソン3の直接シーケンスを試みたが、変異は検出されなかった。

## 考 察

髄芽腫の治療において1970年代の全脳全脊髄照射の導入により長期生存が可能になったが、一方で遅発性放射線障害の問題が新たに出現した。近年は照射時期を遅らせる、線量を減じ

る等新たな試みがなされている。Packerら<sup>54)</sup>は予後との相関性から、発症年齢 (3歳以下)、術後残存腫瘍、髄腔内播種に注目しstandard risk群, high risk群を分類した。各々に照射線量と照射前後の化学療法を設定し (neo-adjuvant療法) 良好な成績を得ている。また、1999年にはstandard risk群の全脳全脊髄線量36Gyを23.4Gyに減量することに成功しており<sup>4)</sup>、現在この治療法が世界標準とされている。Risら<sup>3)</sup>によればそれでも知能指数が年に平均4ポイント低下するとされ、現在線量を18Gyに下げる試みがなされている<sup>46)</sup>。このような試みは一部の患者に腫瘍の不完全な局所制御や早期髄腔内播種を招き、現在もstandard risk群の約1/3は治療抵抗性である<sup>6)</sup>。Davidら<sup>47)</sup>は、1施設の10年間における80例の解析から予後不良と関連するのは髄腔内播種のみで、年齢、術後残存腫瘍は関係しなかったと述べている。本研究でも髄腔内播種の有無は予後と関連したが ( $p=0.0002$ , 図2)、年齢による有意差は得られなかった ( $p=0.78$ , データは示していない)。本研究の症例は収集が長期にわたり、CT, MRI導入以前の症例を含んでいるため、術後残存腫瘍については解析不能であった。以上は必ずしもPackerらによる分類が十分な治療指針ではないことを示している。今後は、high risk群の中から治療の期待できる症例を如何に選別し放射線障害を予防するか、standard risk群の中から予後不良例を如何に抽出し濃厚な治療を行うか、が重要な課題と思われる。

最近の臨床病理学的研究から、組織学的亜型と予後に関して新たな知見が得られている。線維形成型 (desmoplastic type) は髄芽腫の約15%を占め、従来、予後良好な亜型として報告されてきた<sup>6)</sup>。一方で、予後とは関連しなかったとの報告もあり、見解は一定しない<sup>9)</sup>。しかし、線維形成型の中の最も分化した亜型とされるMBEN (medulloblastoma with extensive nodularity) は、ほとんどの症例が3歳以下に発生し極めて予後が良い<sup>6,48)</sup>。本研究のhigh risk群にも亜全摘出術と放射線局所照射のみで30年以上生存しているMBENの1例 (症例1) が含まれていた。このことはhigh risk群にもかかわらず約1/4の症例で治療が得られることに対する一つの説明となりうる。一方予後不良の亜型として、large cell/anaplastic typeが2000年の改訂WHO分類に登場した。本亜型は比較的若年者に多く (平均3.7歳)、発症時より髄腔内播種を伴うことがほとんどで、極めて予後不良である<sup>6,18)</sup>。本研究では2例のlarge cell/anaplastic typeが含まれていた。1例は術後6ヶ月で腫瘍死したが、他方は10年以上の現在も生存し、相反する結果を示している。以上のことは組織型 (表現型) による予後判定にも限界があることを示している。髄芽腫の約80%を占めるclassic or undifferentiated typeは、比較的予後良好から不良まで幅広い臨床像を呈するが、未だ予後因子は不明である。

これまでの分子生物学的解析から予後良好因子としてTrkC遺伝子のmRNAの過剰発現が<sup>49)</sup>、予後不良因子としてはc-myc遺伝子の増幅とmRNAの過剰発現が報告されている<sup>6,11)~14)</sup>。今回我々は、c-myc mRNAの過剰発現が遺伝子増幅のみでは説明し得ないことから、遺伝子増幅によらないc-mycの発現調節機構に注目した。これまでの研究から核内蛋白c-mycは、Wntシグナル伝達系上にあつて $\beta$ -カテニンにより発現調節を受けることが知られている<sup>19)</sup>。 $\beta$ -カテニンのユビキチン分解を負に制御するAPCをコードする遺伝子は、家族性大腸ポリポーシスの原因遺伝子であり、この疾患に合併する脳腫瘍は全て髄芽腫 (Turcot's症候群2型) である<sup>50)</sup>ことが知られている。また弧

発性大腸癌でもほとんどの症例でAPCまたは $\beta$ -カテニンの変異が報告されている<sup>51)</sup>ことから、弧発性髄芽腫においてもAPC, Axin,  $\beta$ -カテニンの変異が期待された。しかし、これまでの報告ではそれぞれ5%程度で、少なくとも $\beta$ -カテニンの活性化だけではc-mycの転写亢進あるいは過剰発現をすることは困難である<sup>21)~26)</sup>。 $\gamma$ -カテニンは $\beta$ -カテニンと同様に細胞接着に関わる細胞膜裏打ち蛋白として同定された。最近、 $\gamma$ -カテニンもWntシグナル上にあつて $\beta$ -カテニンより効率的にc-mycを活性化すること、一方で $\beta$ -カテニンはc-mycよりむしろcyclin D1を活性化すること<sup>27)28)</sup>が明らかにされ、 $\gamma$ -カテニンがc-mycの新たな活性化因子あるいは予後不良因子として考えられるようになった。本研究では $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニンともに変異は検出されず、c-myc, cyclin D1との相関も認められなかった。本研究において $\beta$ -カテニンの変異が、これまでの報告<sup>23)25)</sup> (平均変異率6%) に反して検出されなかったのは、解析した症例数が少なかったためかもしれない。しかし我々の予測とは異なり、生存曲線の解析から $\gamma$ -カテニンの発現のみが予後良好と関連した(図2A)。さらに発症時に髄腔内播種を認めないChang分類M0群内においても $\gamma$ -カテニンの発現が予後と関連した(図2D)。髄芽腫と同様に神経外胚葉系から発生し、好発年齢や組織所見が類似する副腎性神経芽細胞腫では、 $\gamma$ -カテニンの高発現する症例は有意( $p < 0.005$ )に予後良好と報告されている<sup>52)</sup>。また肺癌及び腎細胞癌の培養細胞では $\gamma$ -カテニン遺伝子の導入により腫瘍増殖抑制効果が認められている<sup>53)54)</sup>。一方、ある種の胃癌細胞株では $\gamma$ -カテニンの変異とWntシグナルの持続的活性化が同時に認められるという興味深い報告もなされている<sup>29)</sup>。このことは $\gamma$ -カテニンがcell typeに依存してがん化シグナルとして作用することもあるれば、一方でがん抑制作用を発揮することもありうることを示しており、このような相反する現象は類似分子の $\beta$ -カテニンにおいてすでに知られている<sup>55)</sup>。しかし、これらの発がん・進展に関連する細胞現象に、細胞接着系あるいはシグナル伝達系のいずれがどの程度関与しているかについてはまだ解明されていない。以上の知見と本研究の解析結果から髄芽腫において $\gamma$ -カテニンが腫瘍抑制的に機能している可能性が高いと考えられる。したがって、髄芽腫における $\gamma$ -カテニンの発現評価は、M0症例群とその大多数を占めるstandard risk群の術後生存や予後を推定するうえで臨床的に極めて意義が大きいと思われる。

cyclin D1は細胞周期のG1/S期を制御する重要な核内蛋白質であり、過剰発現によって細胞の異常増殖を来することが知られている<sup>56)</sup>。 $\gamma$ -カテニンとは対照的に、髄芽腫におけるcyclin D1の発現は予後不良の傾向を示した( $p=0.057$ ) (図2B)。cyclin D1に関するこれまでの報告は全て発がん・進展に作用し<sup>40)56)</sup>、本研究もこれに矛盾しない。本研究のcyclin D1陽性例は髄腔内播種の有無を問わず全例死亡した。統計学的有意差は得られていないものの、このことはcyclin D1の発現が治療の個別化に応用できる可能性を示唆している。

本研究には、N-mycの遺伝子増幅を伴い組織学的にlarge cell/anaplastic typeと診断されるにも拘らず、10年以上長期生存している1例(症例16)が存在する(表4)。同じ亜型でもc-mycの遺伝子増幅を認めた一方(症例19)が、診断時に脳脊髄播種を認め術後6ヶ月で腫瘍死したのと対照的である(表4)。N-mycの遺伝子増幅は神経芽細胞腫における重要な予後不良因子で<sup>57)</sup>、髄芽腫におけるこれまでの研究でもlarge

cell/anaplastic typeの組織型と予後不良に関連すると報告されている<sup>15)16)18)</sup>。しかし網膜芽細胞腫では、本遺伝子の増幅は組織学的悪性度や予後と関連しない<sup>58)</sup>とも報告されており、N-mycの遺伝子増幅と予後の関係については今後更なる検討が必要と考えられる。またN-myc遺伝子増幅例(症例16)は、免疫組織化学で $\gamma$ -カテニン陽性かつcyclin D1陰性であったことも注目すべきである。今後、N-mycの遺伝子増幅とこれら分子がどのように関連するか、についても解析が期待される。

## 結 論

髄芽腫24例を対象に、 $\gamma$ -、 $\beta$ -カテニンとその関連分子c-myc, N-myc, cyclin D1について免疫組織化学及び分子生物学的に解析し、臨床的意義を検討した。

1. 診断時に髄腔内播種を認めた症例(Chang分類M1以上は、有意に予後不良( $p=0.0002$ )であったが、これまで予後不良因子とされていた年齢による有意差は得られなかった。

2. 免疫組織化学的には、 $\gamma$ -カテニンの発現を24例中9例(37%)に認め、陽性例は有意( $p=0.003$ )に予後良好であった。さらに、髄腔内播種を認めない症例群(Chang分類M0)においても $\gamma$ -カテニンの発現が予後と関連した( $p=0.022$ )。

3. 免疫組織化学的に、cyclin D1の発現を24例中6例(25%)に認めた。予後との相関は認めなかったが( $p=0.057$ )、陽性例の全例が髄腔内播種の有無にかかわらず腫瘍死した。

4. 組織学的検討により2例のlarge cell/anaplastic typeが診断され、各々c-myc, N-mycの遺伝子増幅を認めた。c-myc増幅例は術後6ヶ月で腫瘍死したが、N-myc増幅例は10年以上生存し対照的な予後を示した。N-myc遺伝子増幅の生物学的意義については更なる検討を要すると思われる。

以上より、 $\gamma$ -カテニンの免疫組織化学的検索はその簡便性からChang分類M0群、特にstandard risk群の治療抵抗例の、クリーニングと治療の個別化に有用と思われる。またcyclin D1の免疫組織化学については個別化の有用な指標となる可能性を示された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を賜りました同室の藤沢弘範助手、ならびに病理標本の作製に御協力を頂いた今村明文部技官に心から感謝の意を表します。また御助言と貴重な試料を頂いた金沢大学大学院医学系研究科がん医科学が分子統御学腫瘍統御学源利成教授に心から感謝します。さらに、御支援と御協力を頂きまし金沢大学脳神経外科学講座の皆様にも深く感謝いたします。

尚、本研究の要旨は日本脳腫瘍病理学会(2003, 東京)ならびに小脳神経外科学会(2003, 新潟)において発表した。

## 文 献

- 1) The Committee of Brain Tumor Registration of Japan Special report of brain tumor registry of Japan (1969-1990) Neurol Med Chir (Tokyo) 39: 59-107, 1999
- 2) Giangaspero F, Bigner SH, Kleihues P, Pietsch J, Trojanowski JQ. Medulloblastoma. In Kleihues P, Caveneo WK(eds), Pathology and genetics. Tumors of the nervous system 2<sup>nd</sup>, p129-137, IARC Press, Lyon, 2000
- 3) Ris MD, Packer RJ, Goldwein J, Wallace DJ, Boyett JT Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: A Childrer



Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 19: 3470-3476, 2001

- 4) Packer RJ, Goldwein J, Nicholson HS, Vezina LG, Allen JC, Ris MD, Muraszko K, Rorke LB, Wara WM, Cohen BH, Boyett JM. Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 17: 2127-2136, 1999
- 5) Packer RJ. Childhood medulloblastoma: progress and future challenges. *Brain Dev* 21: 75-81, 1999
- 6) Ellison DW. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28: 257-282, 2002
- 7) Jenkin D, Shabanah MA, Shail EA, Gray A, Hassounah M, Khafaga Y, Kofide A, Mustafa M, Schultz H. Prognostic factors for medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47: 573-584, 2000
- 8) Russo C, Pellarin M, Tingby O, Bollen AW, Lamborn KR, Mohapatra G, Collins VP, Feuerstein BG. Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors. *Cancer* 86: 331-339, 1999
- 9) Nicholson JC, Ross FM, Kohler JA, Ellison DW. Comparative genomic hybridization and histological variation in primitive neuroectodermal tumors. *Br J Cancer* 80: 1322-1331, 1999
- 10) Michiels EMC, Weiss MM, Hoovers JMN, Baak JPA, Voute PA, Baas F, Hermesen MAJA. Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol* 24: 205-210, 2002
- 11) Aldosari N, Bigner SH, Burger PC, Becker L, Kepner JL, Friedman HS, McLendon RE. MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. *Arch Pathol Lab Med* 126: 540-544, 2002,
- 12) Grotzer MA, Hogarty MD, Janss AJ, Liu X, Zhao H, Eggert A, Sutton LN, Rorke LB, Brodeur GM, Phillips PC. MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 7: 2425-2433, 2001
- 13) Herms J, Neidt I, Luscher B, Sommer A, Schurmann P, Schroder T, Bergmann M, Wilken B, Probst-Cousin S, Hernaiz-Driever P, Behnke J, Hanefeld F, Pietsch T. c-myc expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer* 89: 395-402, 2000
- 14) Badiali M, Pession A, Basso G, Andreini L, Rigobello L, Galassi E, Giangaspero F. N-myc and c-myc oncogenes amplification in medulloblastomas. Evidence of particularly aggressive behavior of a tumor with c-myc amplification. *Tumori* 77: 118-121, 1991
- 15) Eberhart CG, Kratz JE, Schuster A, Goldthwaite P, Cohen KJ, Perlman EJ, Burger PC. Comparative genomic hybridization detects an increased number of chromosomal alterations in large cell/ anaplastic medulloblastomas. *Brain Pathol* 12: 36-44, 2002
- 16) Reardon DA, Jenkins JJ, Sublett JE, Burger PC, Kun LE. Multiple genomic alterations including N-myc amplification in a primary large cell medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 32: 187-

191, 2000

- 17) Leonard JR, Cai DX, Rivet DJ, Kaufman BA, Park TS, Levy BK, Perry A. Large cell/anaplastic medulloblastomas and medulloblastomas: clinicopathological and genetic features. *J Neurosurg* 95: 82-88, 2001
- 18) Brown HG, Kepner JL, Perlman EJ, Friedman HS, Strother DR, Duffner PK, Kun LE, Goldthwaite PT, Burger PC. Large cell/anaplastic medulloblastomas: A pediatric oncology group study. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 857-865, 2000
- 19) He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Costa LTD, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-myc as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512, 1998
- 20) Siu IM, Lal A, Blankenship JR, Aldosari N, Riggins G. c-Myc promoter activation in medulloblastoma. *Cancer Res* 63: 4773-4776, 2003
- 21) Yokota N, Nishizawa S, Ohta S, Date H, Sugimura H, Namba H, Maekawa M. Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int J Cancer* 101: 198-201, 2002
- 22) Koch A, Waha A, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Wolter M, Reifenberger J, Hartmann W, Friedl W, Reifenberger G, Wiestler OD, Pietsch T. Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer* 93: 445-449, 2001
- 23) Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol* 156: 433-437, 2000
- 24) Eberhart CG, Tihan T, Burger PC. Nuclear localization and mutation of  $\beta$ -catenin in medulloblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 333-337, 2000
- 25) Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res* 58: 896-899, 1998
- 26) Baeza N, Masuoka J, Kleihues P, Ohgaki H. Axin1 mutations but not deletions in cerebellar medulloblastomas. *Oncogene* 22: 632-636, 2003
- 27) Kolligs FT, Kolligs B, Majra KM, Hu G, Tani M, Cho KR, Fearon ER.  $\gamma$ -Catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of  $\beta$ -catenin. *Genes Dev* 14: 1319-1331, 2000
- 28) Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* 22: 961-965, 2000
- 29) Caca K, Kolligs FT, Ji X, Hayes M, Qian JM, Yahanda A, Rimm DL, Costa J, Fearon ER.  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/Lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ* 10: 369-376, 1999
- 30) Syrigos KN, Harrihgton K, Waxman J, Krausz T, Pignatelli M. Altered  $\gamma$ -catenin correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol* 160: 1889-1893, 1998
- 31) Visca P, Alo PL, Dei Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F, Filippi S, Di Tondo U, Donnorso RP. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent

- nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 5: 4111-4118, 1999
- 32) Vicente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, López-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 38: 301-308, 2002
- 33) Nawrocki B, Polette M, Hengel JV, Tournier JM, Roy FV, Birembaut P. Cytoplasmic redistribution of E-cadherin-catenin adhesion complex is associated with down-regulated tyrosine phosphorylation of E-cadherin in human bronchopulmonary carcinomas. *Am J Pathol* 153: 1521-1530, 1998
- 34) Kaneko T, Yamashita T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H, Yamashita J. Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas: a novel hypothesis of tumorigenesis. *Cancer* 92: 2662-2672, 2001
- 35) Lee SE, Johnson SP, Hale LP, Li J, Bullock N, Fuchs H, Friedman A, McLendon R, Bigner DD, Modrich P, Friedman HS. Analysis of DNA mismatch repair proteins in human medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 4: 1415-1419, 1998
- 36) Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 155: 387-394, 1999
- 37) Iwato M, Tachibana O, Tohma Y, Nitta H, Hayashi Y, Yamashita J. Molecular analysis for p53 and mdm2 in intracranial germ cell tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 21-25, 2000
- 38) Kawate S, Fukusato T, Ohwada S, Watanuki A, Morishita Y. Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: Correlation with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression. *Oncology* 57: 157-163, 1999
- 39) Gilbert J, Norris MD, Haber M, Kavallaris M, Marshall GM, Stewart BW. Determination of N-myc gene amplification in neuroblastoma by differential polymerase chain reaction. *Mol Cell Probe* 7: 227-234, 1993
- 40) Khoo MLC, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1810-1813, 2002
- 41) Kandel R, Zhu XL, Li SQ, Rohan T. Cyclin D1 protein overexpression and gene amplification in benign breast tissue and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 10: 43-51, 2001
- 42) Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 7: 871-875, 1997
- 43) Fujisawa H, Marukawa K, Hasegawa M, Tohma Y, Hayashi Y, Uchiyama N, Tachibana O, Yamashita J. Genetic differences between neurocytoma and dysembryoplastic neuroepithelial tumor and oligodendroglial tumors. *J Neurosurg* 97: 1350-1355, 2002
- 44) Chang CH, Housepian EM, Herbert C J. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology* 93: 1351-1359, 1969
- 45) Packer RJ, Sutton LN, D'Angio G, Evans AE, Schut L. Management of children with primitive neuroectodermal tumors of the posterior fossa/medulloblastoma. *Pediatr Neurosci* 12: 272-282, 1985-86
- 46) Ellison DW, Clifford SC, Gajjar A, Gilbertson R. What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma. *Eur J Pediatr Neurol* 7: 53-66, 2003
- 47) David KM, Casey ATH, Hayward RD, Harkness WFJ, Phipps K, Hons BS, Wade AM. Medulloblastoma: is the 5-year survival rate improving? A review of 80 cases from a single institution. *J Neurosurg* 86: 13-21, 1997
- 48) Giangaspero F, Perilongo G, Fondelli MP, Brisigotti M, Carollo C, Burnelli R, Burger PC, Garre ML. Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *J Neurosurg* 91: 971-977, 1999
- 49) Grotzer MA, Janss AJ, Fung KM, Biegel JA, Sutton LN, Rorke LB, Zhao H, Cnaan A, Phillips PC, Lee VMY, Trojanowski JQ. TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 18: 1027-1035, 2000
- 50) Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332: 839-847, 1995
- 51) Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1: 229-233, 1992
- 52) Amitay R, Nass D, Meitar D, Goldberg I, Davidson B, Trakhtenbrot L, Simoni FB, Ben-Ze'ev A, Rechavi G, Kaufmann Y. Reduced expression of plakoglobin correlates with adverse outcome in patients with neuroblastoma. *Am J Pathol* 159: 43-49, 2001
- 53) Winn RA, Bremnes RM, Bemis L, Franklin WA, Miller YE, Cool C, Heasley LE.  $\gamma$ -Catenin expression is reduced or absent in subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. *Oncogene* 21: 7497-7506, 2002
- 54) Simcha I, Geiger B, Levenberg SY, Salomon D, Ze'ev AB. Suppression of tumorigenicity by plakoglobin: An augmenting effect of N-cadherin. *J Cell Biol* 133: 199-209, 1996
- 55) Minamoto T, Ougolkov AV, Mai M. Detection of oncogenes in the diagnosis of cancers with active oncogenic signaling. *Expert Rev Mol Diagn* 2: 89-99, 2002
- 56) Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 20: 501-534, 1999
- 57) Lastowska M, Cullinane C, Variend S, Cotterill S, Bown N, O'Neill S, Mazzocco K, Roberts P, Nicholson J, Ellershaw C, Pearson ADJ, Jackson MS. Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. *J Clin Oncol* 19: 3080-3090, 2001
- 58) Lillington DM, Goff LK, Kingston JE, Onadim X, Price E, Domizio P, Young BD. High level amplification of N-myc is not associated with adverse histology or outcome in primary retinoblastoma tumors. *Br J Cancer* 87: 779-782, 2002

**Immunohistochemical and cytogenetic analyses of medulloblastoma and its clinical relevance: with special reference to c-myc, N-myc,  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenins, and cyclin D1** Koichi Misaki, Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **112**, 140 — 150 (2003)

**Key words** medulloblastoma, c-myc, N-myc,  $\gamma$ -catenin, cyclin D1

#### Abstract

Medulloblastoma is a malignant cerebellar tumor that occurs in children and is difficult to cure because it recurs and disseminates into the cerebrospinal fluid (CSF) space. Despite extensive molecular analyses, the genetic pathway responsible for medulloblastoma genesis remains unclear. Gene amplification and mRNA overexpression of the c-myc gene are reported to be adverse prognostic indicators. However, the frequency of mRNA overexpression (50%) cannot be explained by gene amplification (4%) alone, and therefore, other mechanisms independent of gene amplification may exist. Because c-myc is located downstream of the *Wnt* signal pathway, we examined associated molecules in primary tumors by immunohistochemical and cytogenetic analyses, and discussed their clinical relevance. Twenty-four medulloblastomas were studied. Immunohistochemistry of c-myc,  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenins, and cyclin D1 was performed, and differential PCR was conducted for the gene amplification of c-myc, N-myc and cyclin D1. Mutations of  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenins were examined by PCR-SSCP analysis and direct DNA sequencing. Western blot analysis was available in 5 cases. The clinical significance of the results was statistically analyzed by the Kaplan-Meier method.  $\gamma$ -Catenin was expressed in the cytoplasm and cell membrane in 9 cases (37%). Cytoplasmic/membranous staining of  $\beta$ -catenin was detected in 19 cases (79%). Cyclin D1 and c-myc were expressed in the nucleus in 6 (25%) and 21 cases (83%), respectively. The expression of  $\gamma$ -catenin in immunohistochemistry was confirmed by western blotting and the expression levels were well correlated between the two. c-myc and N-myc amplification was detected separately in two cases. Although they were histologically diagnosed as large cell/anaplastic medulloblastoma, a highly aggressive subtype with dismal prognosis, the patient with c-myc amplification expired 6 months after surgery whereas the one with N-myc amplification is still alive over 10 years. Mutations of  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenins were not found. Statistically, patients without CSF dissemination (Chang M0) showed significantly better outcome than those with dissemination (Chang M1 ~ 3) ( $p=0.0002$ ), and only  $\gamma$ -catenin expression correlated with good prognosis ( $p=0.003$ ) among the molecules analyzed. Furthermore,  $\gamma$ -catenin expression was also significant in the M0 group ( $p=0.022$ ). Although insignificant ( $p=0.057$ ), cyclin D1 expression showed a trend of adverse outcome and all patients with cyclin D1 expression expired. The expression of  $\beta$ -catenin and c-myc did not correlate with prognosis ( $p=0.31$  and  $0.53$ , respectively). In conclusion, the immunohistochemistry of  $\gamma$ -catenin is useful for further stratification or individualization in medulloblastoma treatment. It was also found that cyclin D1 expression has the potential to be an adverse prognostic indicator.